

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
US Department of Commerce  
United States Patent and Trademark  
Office, PCT  
2011 South Clark Place Room  
CP2/5C24  
Arlington, VA 22202  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

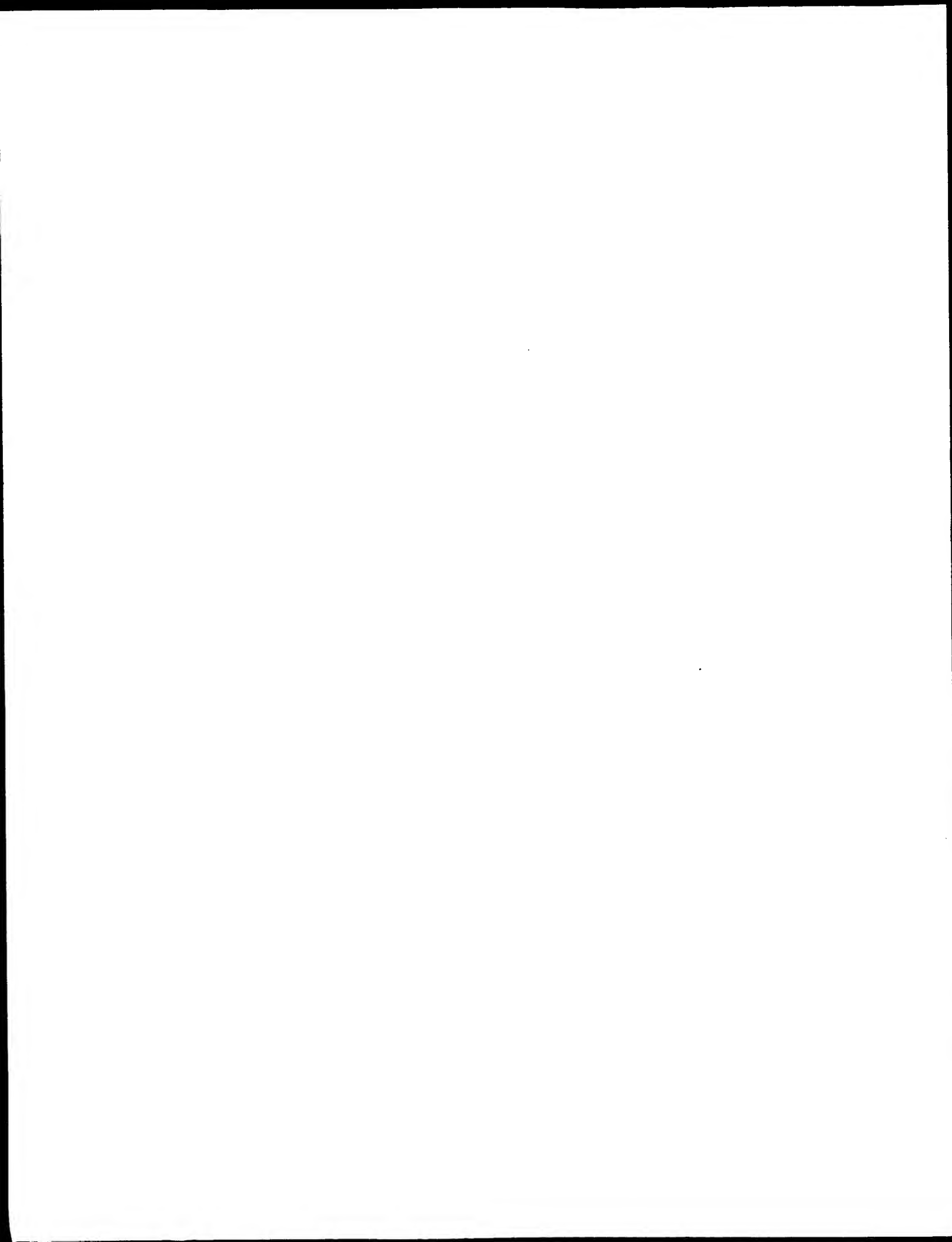
Date of mailing (day/month/year) 18 June 2001 (18.06.01)	
International application No. PCT/EP00/09588	Applicant's or agent's file reference 20597P WO
International filing date (day/month/year) 29 September 2000 (29.09.00)	Priority date (day/month/year) 29 September 1999 (29.09.99)
Applicant SIMONS, Mikael et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:06 April 2001 (06.04.01)☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Olivia TEFY Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---



**(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG**

**(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum**  
Internationales Büro



**(43) Internationales Veröffentlichungsdatum**  
5. April 2001 (05.04.2001)

**PCT**

**(10) Internationale Veröffentlichungsnummer**  
**WO 01/22957 A2**

**(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>:** A61K 31/00

**(21) Internationales Aktenzeichen:** PCT/EP00/09588

**(22) Internationales Anmeldedatum:**  
29. September 2000 (29.09.2000)

**(25) Einreichungssprache:** Deutsch

**(26) Veröffentlichungssprache:** Deutsch

**(30) Angaben zur Priorität:**  
199 46 737.4 / 29. September 1999 (29.09.1999) DE

**(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US):** MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR  
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.  
[DE/DE]; Hofgartenstrasse 8, 80539 München (DE).

**(72) Erfinder; und**

**(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):** SIMONS, Mikael  
[FI/DE]; Amselweg 48, 72076 Tübingen (DE).

FRIEDRICHSON, Tim [DE/DE]; Rathenower Strasse  
32, 10559 Berlin (DE). SIMONS, Kai [FI/DE];  
Kleinschmidtstrasse 27/1, 69115 Heidelberg (DE).  
KURZCHALIA, Teymuras [GE/DE]; Fehrbelliner  
Strasse 97, 10119 Berlin (DE).

**(74) Anwälte:** WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9,  
81679 München (DE).

**(81) Bestimmungsstaaten (national):** CA, JP, US.

**(84) Bestimmungsstaaten (regional):** europäisches Patent (AT,  
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, SE).

**Veröffentlicht:**

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

**(54) Title:** USE OF GANGLIOSIDES AND OTHER SUBSTANCES FOR MODULATING SPHINGOLIPID-CHOLESTEROL  
MICRODOMAINS

**(54) Bezeichnung:** VERWENDUNG VON GANGLIOSIDEN UND ANDEREN SUBSTANZEN ZUR MODULATION VON  
SPHINGOLIPID-CHOLESTERIN-MIKRODOMÄNEN

**(57) Abstract:** The invention relates to the use of gangliosides and other substances for producing an agent for modulating sphin-  
golipid-cholesterol microdomains.

**(57) Zusammenfassung:** Es wird die Verwendung von Gangliosiden und anderen Substanzen zur Herstellung eines Mittels zur  
Modulation von Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen beschrieben.

WO 01/22957 A2



## Verwendung von Gangliosiden und anderen Substanzen zur Modulation von Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen

### Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Gangliosiden und anderen Substanzen zur Herstellung eines Mittels zur Modulation von Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen.

Bei Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen, die auch Sphingolipid-Cholesterin-Flöße genannt werden, handelt es sich um laterale Anordnungen von spezifischen Lipiden, insbesondere Sphingolipiden einschließlich Gangliosiden und Cholesterin sowie Proteinen in Zellmembranen (K. Simons et al., Nature, Vol. 387 (1997), 569 - 572; T. Friedrichson et al., Nature, Vol. 394 (1998), 802 - 805). Es sind kleine und hochdynamische Strukturen, die durch Anziehungskräfte zwischen Sphingolipiden und Cholesterin gebildet werden. Mit den Sphingolipid-Cholesterin-Strukturen sind verschiedene Proteine assoziiert, einschließlich GPI-APs (Glykosyl-Phosphatidyl-Ankerproteine), Kinasen der Familie Src, Influenza Virus Hämagglutinin (HA) und Caveolin-1. Die meisten der mit den Sphingolipid-Cholesterin-Flößen assoziierten Proteine enthalten post-translationale Lipidmodifikationen, wobei GPI-verankerte Proteine in der Zellmembran über eine Lipideinheit verankert sind, wohingegen Kinasen der Familie Src, NO-Synthasen (NOS), HA und Caveolin acyliert sind. Die mit den Flößen assoziierten Proteine sind üblicherweise in kalten, nicht-ionischen Detergenzien, wie etwa Triton X-100, nur schlecht löslich, was möglicherweise auf ihren lipophilen Charakter zurückzuführen ist. In Triton unlösliche Komplexe wurden bezüglich ihrer Funktion als Flöße definiert, die spezifisch an bestimmten Lipiden, insbesondere Sphingolipiden einschließlich Gangliosiden, und Cholesterin, angereichert sind, während andere Lipide, wie etwa Glycerophospholipide, in den Triton-Extrakten

- 2 -

selektiv fehlen (Brown et al., Trends Cell Biol. 2 (1992), 338 - 343; Fiedler et al., Biochemistry 32 (1993), 6365 - 6373).

Die Existenz von Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen bzw. Flößen in  
5 lebenden Zellen, insbesondere die Existenz von Mikrodomänen von GPI-  
verankerten Proteinen in lebenden Zellen, die durch die Verabreichung von  
Cholesterin beeinflusst werden können, wurde kürzlich durch einen  
chemischen Quervernetzungsansatz (Friedrichson et al., supra) und ein  
Fluoreszenz-Energietransfer-Verfahren (Varma et al., Nature 394 (1998),  
10 798 - 802) gezeigt. Weiterhin wurde postuliert, dass die Flöße als  
Plattformen, an die Proteine binden können, eine wichtige Rolle bei  
Membrantransport- und Signalübertragungseigenschaften spielen.

Eine Aufgabe der Erfindung war es deshalb, ein Mittel zur Modulation von  
15 Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen bereitzustellen (und zwar  
insbesondere deren Aufbau oder/und Eigenschaften), um auf die durch diese  
Mikrodomänen beeinflussten Vorgänge gezielt einwirken zu können.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch die Verwendung von  
20 Gangliosiden und anderen Substanzen zur Herstellung eines Mittels zur  
Modulation von Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung konnte festgestellt werden, dass mit  
Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen assoziierte Proteine, insbesondere  
25 GPI-verankerte Proteine, in den Mikrodomänen in Form von quervernetzten  
Clustern auf der Oberfläche von lebenden Zellen vorliegen. Durch die  
Zugabe von Gangliosiden und anderen Substanzen, wie Cholesterinsulfat,  
wird die Quervernetzung von mit den Flößen assoziierten, insbesondere GPI-  
verankerten Proteinen gehemmt und darüber hinaus deren Löslichkeit in  
30 Detergenzien erhöht.

- 3 -

Die Verabreichung von Gangliosiden und anderen Substanzen führt somit zu einer Veränderung des strukturellen Aufbaus der Mikrodomänen, sodass diese zur Modulation von Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen und den dort stattfindenden Vorgängen eingesetzt werden können.

5

Es wird angenommen, dass durch die Verabreichung von Gangliosiden und anderen Substanzen Proteine, insbesondere GPI-verankerte Proteine, aus den Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen verdrängt werden, indem die Anziehungskräfte zwischen der Ankergruppe und den umgebenden Lipiden gestört werden. Dies hat zur Folge, dass die in den Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen vorliegenden Proteine bei Zugabe von Gangliosiden und anderen Substanzen aus ihrer Lipidumgebung herausgelöst werden und nicht mehr mit den Flößen assoziiert vorliegen.

15

Als Folge davon verändert die Zugabe von exogenen Gangliosiden z.B. die Löslichkeit von GH-DAF (Wachstumshormon (GH; growth-hormone) verknüpft mit dem GPI-Anker des DAF (Decay accelerating factor)), einer Glykosyl-Phosphatidylinositol-verankerten Wachstumshormon-Form, in Detergenzien. Es ist bekannt, dass GPI-verankerte Proteine in nicht-ionischen Detergenzien im wesentlichen unlöslich sind (Brown et al., Cell 68 (1992), 533 - 544), während eine Verringerung des Cholesteringehalts in den Zellen die Detergenz-Solubilität von GPI-APs erhöht (Cerneus et al., J. Biol. Chem. 268 (1993), 3150 - 3155; Hanada et al., J. Biol. Chem. 270 (1995), 6254 - 6260). Dies bedeutet, dass die Wechselwirkungskräfte zwischen den Lipidbestandteilen und den Proteinen der Mikrodomänen größer als die Lösekräfte durch nicht-ionische Detergenzien sind. Werden jedoch die Mikrodomänen durch Herausnahme des Bestandteils Cholesterin verändert oder zerstört, dann werden die Wechselwirkungskräfte zwischen den Lipiden und den Proteinen verringert und die Proteine können durch nicht-ionische Detergenzien aus den Flößen herausgelöst werden.

30

- 4 -

Überraschenderweise wurde nun gefunden, dass bei Zugabe von Gangliosiden und anderen Substanzen, die bevorzugt ebenfalls einen Lipidbestandteil der Flöße darstellen, das Gegenteil zutrifft, dass also die Zugabe von Gangliosiden zu Zellen die Detergenz-Solubilität von GH-DAF erhöht. Diese Feststellung ist unerwartet, da man annehmen würde, dass eine Erhöhung der Konzentration eines in den Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen vorkommenden Lipids eine Stabilisierung dieser Domänen bewirken würde. Tatsächlich stört die Zugabe von Gangliosiden jedoch das Quervernetzen der Proteine und erhöht die Detergenz-Solubilität von GH-DAF. Ganglioside bewirken somit eine Modulation der Mikrodomänen, insbesondere eine Verdrängung von Proteinen, insbesondere GPI-APs aus den Flößen.

Dies wird dadurch bestätigt, dass Ganglioside das Copatching von HA und GH-DAF stören. Das Copatching von zwei Mikrodomänkomponenten ist eine Folge der Koaleszenz einer gemeinsamen Lipidmikrodomäne.

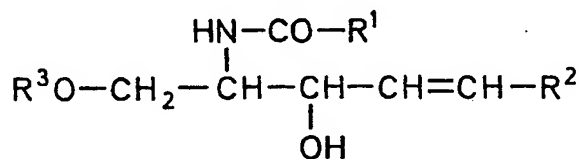
Die Modulation der Mikrodomänen durch die Ganglioside erfolgt bevorzugt spezifisch und reversibel, d.h. bei Wegnahme der Ganglioside und anderen Substanzen wird wieder die ursprüngliche, unveränderte Struktur der Mikrodomänen erhalten.

Erfindungsgemäß bevorzugt wird also durch die Verwendung von Gangliosiden die Lokalisierung von Proteinen auf Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen beeinflusst, insbesondere die Lokalisierung von Ankerproteinen, acylierten Proteinen, Src-Kinasen oder/und Cholesterin- oder GPI-verankerten Proteinen. Durch die Zugabe von Gangliosiden wird die Anordnung von in Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen vorliegenden Proteinen verändert, was zu einer Modulation oder/und Veränderung der Struktur oder/und des Aufbaus der Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen führt. Besonders bevorzugt wird ein Clusterabbau der Proteine bewirkt.



Die erfindungsgemäß verwendeten Ganglioside werden bevorzugt ausgewählt aus Rinderhirngangliosiden, GM<sub>1</sub>, GD1a, GD1b, GD3, GM2, GM3, GQ1a, GQ1b oder/und Globosiden. Besonders bevorzugt werden exogene Ganglioside und deren Derivate, wie z.B. ungesättigtes Sphingosin oder Ceramid mit kurzen oder ungesättigten Fettsäuren, verwendet, die bereits Bestandteil der zu behandelnden Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen sind. Aber auch Cholesterinsulfat und andere Cholesterin-Derivate können eingesetzt werden.

Die Begriffe Gangliosid bzw. Gangliosid-Derivate, wie hierin verwendet, umfassen insbesondere Glykolipide, die als Bausteine von Zell-Membranen im Nervengewebe auftreten. Die Ganglioside bzw. Gangliosid-Derivate enthalten bevorzugt mehrere Monosaccharideinheiten pro Molekül. Geeignete Monosaccharideinheiten, die in den Gangliosiden bzw. Gangliosid-Derivaten enthalten sein können, sind beispielsweise D-Galactose, N-Acetyl-D-Galactosamin, D-Glucose und N-Acetyl-Neuraminsäure. Besonders bevorzugt sind Ganglioside, die Derivate von Sphingosin (2-Amino-4-octadecen-1,3-diol, Sphing-4-enin) sind, wobei insbesondere über den Sauerstoff am C-1 Zuckerreste angebunden sind und über den Stickstoff am C-2 eine kurze (insbesondere C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>-) Fettsäure gebunden ist, welche gesättigt oder ungesättigt sein kann. Weiterhin bevorzugt sind Ganglioside, die ein Derivat eines Ceramids sind. Ceramide sind lipophile Amide der allgemeinen Formel



wobei R<sup>1</sup> ein langkettiger Fettsäurerest, insbesondere ein C<sub>6</sub>-C<sub>30</sub>-, mehr bevorzugt ein C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub>-Fettsäurerest ist, R<sup>2</sup> ein langkettiger Alkylrest, insbesondere ein C<sub>6</sub>-C<sub>30</sub>-, mehr bevorzugt ein C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub>-Alkylrest ist und R<sup>3</sup> H ist. In den Ceramid enthaltenden Gangliosiden wird R<sup>3</sup> bevorzugt durch Zuckerreste ersetzt (Glycoside).

Somit umfassen Gangliosid-Derivate bevorzugt Ceramid und dessen Derivate und verwandte Verbindungen einschließlich Sphingosine und Ganglioside und deren Derivate, wobei auch eine der folgenden funktionalen Gruppen an das Grundgerüst, insbesondere das Ceramidgrundgerüst substituiert oder addiert sein kann: ein Halogenidatom, gebunden an einen Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl- oder Arylrest, eine Alkoholgruppe (primär, sekundär oder tertiär), eine Ethergruppe, eine Carbonylfunktion (z.B. Aldehyd oder Keton), eine Carbonsäuregruppe, eine Carbonsäureanhydridgruppe, eine Carbamoylgruppe, eine Haloformylgruppe, eine Cyanogruppe, eine Estergruppe, einschließlich einer Lactongruppe, ein Benzyl, Phenyl, Toly, Tosyl, eine Sulfonylgruppe, eine Aminogruppe (primär, sekundär oder tertiär), ein Isocyanat, ein Cyanat, ein Thioisocyanat, ein Thiocyanat, ein Carbamat, ein Azid, eine Diazogruppe oder eine Quinongruppe. Weitere Gruppen, die an die Cholesterineinheit gebunden sein können, umfassen ein Oligopeptid umfassend zwei bis 20, bevorzugt 8 bis 12, insbesondere 8, 10 oder 12 Aminosäurereste, ein Oligonukleotid, einzelne Aminosäuren, Monosaccharide, Disaccharide oder Polysaccharide.

Unter den Begriff Cholesterinderivate fallen alle Substanzen, die durch Substitution oder Addition von Gruppen aus Cholesterin gebildet worden sind. Insbesondere werden als Cholesterin-Derivate Verbindungen verstanden, die aus Cholesterin in nur einem Reaktionsschritt gebildet werden und zu Cholesterin in einem engen chemischen Verwandtschaftsgrad stehen. Cholesterinderivate umfassen Cholesterinsulfat, Cholesterinthiosulfat und alle Cholesterinderivate, bei denen organische Gruppen an die Cholesterineinheit substituiert oder addiert sind. Geeignete substituierte oder addierte Gruppen umfassen: ein Halogenidatom, gebunden an einen Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl- oder Arylrest, eine Alkoholgruppe (primär, sekundär oder tertiär), eine Ethergruppe, eine Carbonylfunktion (z.B. Aldehyd oder Keton), eine Carbonsäuregruppe, eine Carbonsäureanhydridgruppe, eine Carbamoylgruppe, eine Haloformylgruppe, eine Cyanogruppe, eine Estergruppe, einschließlich einer Lactongruppe, ein

Benzyl, Phenyl, Toly, Tosyl, eine Sulfonylgruppe, eine Aminogruppe (primär, sekundär oder tertiär), ein Isocyanat, ein Cyanat, ein Thioisocyanat, ein Thiocyanat, ein Carbamat, ein Azid, eine Diazogruppe oder eine Quinongruppe. Weitere Gruppen, die an die Cholesterineinheit gebunden sein können, umfassen ein Oligopeptid umfassend zwei bis 20, bevorzugt 8 bis 12, insbesondere 8, 10 oder 12 Aminosäurereste, ein Oligonukleotid, einzelne Aminosäuren, Monosaccharide, Disaccharide oder Polysaccharide.

Bevorzugte Cholesterinderivate sind beispielsweise Cholesterinsulfat, sowie Cholesterinmoleküle, die an der OH-Funktion derivatisiert sind.

Weiterhin stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren bereit, mit dem die Zielrichtung und Verarbeitung der genannten Wirkstoffe, also der Ganglioside, Gangliosidderivate und Cholesterinderivate verfolgt und beobachtet werden kann, indem man eine nachweisbare Gruppe, beispielsweise eine fluoreszierende Gruppe an eine der zuvor aufgeführten Verbindungen, beispielsweise durch Substitution oder Addition anbringt.

Unter den Begriff "Modulation" fällt erfindungsgemäß jede strukturelle und chemische Veränderung der Mikrodomänen, insbesondere eine Veränderung im strukturellen Aufbau oder/und in der Zusammensetzung der einzelnen Bestandteile der Mikrodomänen. Die Modulation der Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen ihrerseits bewirkt bevorzugt eine Veränderung der Membrantransport-, Signalübertragungs- und/oder Zelladhäsionseigenschaften und/oder eine Veränderung von enzymatischen Prozessen. Diese Wirkungen werden durch die Verwendung von Gangliosiden und anderen Substanzen zur Modulation, also insbesondere zur Veränderung der Struktur von Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen hervorgerufen. So können durch eine Veränderung der Sphingolipid-Cholesterin-Flöße durch exogen zugegebene Ganglioside und andere Substanzen Signalübertragungseigenschaften beeinflusst werden. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Zugabe von Gangliosiden zu Zellen den

Autophosphorylierungsgrad vieler Kinasen verändert. Die Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen stellen somit Plattformen für verschiedene Prozesse, insbesondere für Signalübertragungsvorgänge dar, die erfindungsgemäß durch Modulation der Mikrodomänen mit Gangliosiden beeinflusst werden können. Die Modulation der Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen kann auch die Phagozytose von Bakterien und Parasiten in Säugerzellen verhindern. Die Modulation der Sphingolipid-Cholestesrin-Mikrodomänen kann auch die Aufnahme von Viren in Säugerzellen sowie deren Transport und Freisetzung verhindern.

GPI-verankerte Proteine assoziieren z.B. mit Tyrosinkinasen der Src-Familie (Brown, Trends Cell Biol. 2 (1992), 338 - 342). Zusätzlich sind in den Caveolae, Plasmamembraneinbuchtungen, die beim Sequestern und Organisieren von Floß-Lipiddomänen involviert sind, Zellsignalproteine konzentriert. Viele Signalübertragungsmoleküle sind mit Sphingolipid-Cholesterin-Flößen oder Caveolae assoziiert, wie etwa PDGF (platelet derived growth factor), EGF (epidermal growth factor), Proteinkinase C und der Insulinrezeptor. Die durch diese Moleküle vermittelten Signalübertragungswege können durch die exogene Zugabe von Gangliosiden und anderen Substanzen gehemmt werden. Es wurde nun festgestellt, dass durch Ganglioside diese Signalübertragungswege moduliert werden, indem z.B. eine ein Clusterabbau von Protein enthaltenden Mikrodomänen, insbesondere von GPI-AP enthaltenden Mikrodomänen bewirkt wird.

Von der Anordnung von Lipid- und Proteinkomponenten in den Flößen hängen noch weitere Signalübertragungsvorgänge ab. Eine Modulation, insbesondere ein Abbau von Flößen durch exogene Verabreichung von Gangliosiden kann z.B. bewirkt werden, um eine Mikrodomänen-abhängige Signalübertragung zu antagonisieren. Zu diesen Signalübertragungsvorgängen gehören u.a. ein Antikörper induziertes Patching von GPI-verankerter PLAP (placental alkaline phosphatase), was zu einer

Akkumulation der Src-ähnlichen Tyrosinkinase fyn führt (Harder et al., J. Cell. Biol. 141 (1998), 929 - 942). Weiterhin wurden physiologische Reaktionen, die durch Mikrodomänen-Cluster induziert werden, für Lymphozyten beschrieben (Brown, Curr. Opin. Immunol. 5 (1993), 349 - 354). So führt ein Antikörper-induziertes Quervernetzen von GPI-verankerten Proteinen zur Aktivierung von T-Lymphozyten (Thomas et al., J. Biol. Chem. 267 (1992), 12317 - 12322) und das Quervernetzen des IgE-Rezeptors FcεRI verursacht eine allergische Reaktion einschließlich einer Sekretion von Histamin in Mastzellen (Holowka et al., Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 25 (1996), 73 - 80; Field et al., J. Biol. Chem. 272 (1997), 4276 - 4280). Weiterhin können Ganglioside zur Behandlung von Krankheiten eingesetzt werden, die mit einer Zellbewegung in Zusammenhang stehen, wie etwa die Bekämpfung von Tumoren bzw. Metastasen. Tumorzellen nutzen den oben genannten Mechanismus, um der Immunantwort zu entkommen. Durch Flöße vermittelte Prozesse können somit durch Ganglioside beeinflusst werden, wie etwa die T-Zellen-Aktivierung in Gegenwart von Tumorzellen. Durch den erfindungsgemäßen Einsatz von Gangliosiden und anderen Substanzen ist es möglich, Funktionen, die von Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen beeinflusst werden, zu modulieren und damit gezielt zu beeinflussen.

Weiterhin wurde festgestellt, dass bei der Zugabe von Gangliosiden zu Zellen ein Anstieg der Autophosphorylierung von verschiedenen Proteinkinasen beobachtet werden kann.

Darüber hinaus können die Ganglioside und anderen Substanzen als Mittel zur Aufklärung der Pathogenese von Erkrankungen verwendet werden, die mit Aktivitäten an Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen assoziiert sind. So wurde kürzlich gezeigt, dass eine Verringerung des Cholesterins von Hippocampus-Neuronen die Sekretion des  $\beta$ -Amyloidpeptids hemmt, woraus sich ergibt, dass die Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen eine wichtige Rolle bei der proteolytischen Verarbeitung des Amyloidvorläuferproteins

(APP) bei der Alzheimer'schen Erkrankung spielen (Simons et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998), 6460 - 6464). Die Transformation des GPI-verankerten Prionproteins zur Scrapie-Proteinisoform wurde ebenfalls mit Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen in Verbindung gebracht (Taraboulos et al., J. Cell Biol. 129 (1995), 121 - 132). Bevorzugt werden deshalb die Ganglioside derart verwendet, dass die Modulation der Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen eine Veränderung der Proteolyse des Amyloid-Vorläuferproteins der Alzheimer-Erkrankung oder eine Modifikation eines Prionproteins bewirkt.

Die erfindungsgemäße Modulation von Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen kann sowohl für therapeutische, präventive als auch diagnostische Zwecke von Interesse sein. Die Ganglioside werden dabei bevorzugt in einer Dosis von 3, bevorzugt von mindestens 5 bis zu 30 und bevorzugt bis zu 20 mg pro kg pro Tag verabreicht.

In einem in vitro System (Zellkultur) beträgt die Dosis, die experimentell verwendet wird, um eine Reaktion hervorzurufen 1 mg/ml für etwa 10 bis 12 Stunden. Unter Berücksichtigung der Pufferwirkung von Blut, Plasma und Zellen in Tieren oder Menschen ergibt sich daraus ein Dosisbereich von 3 bis 30 mg/kg pro Tag.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele und die beigefügten Figuren weiter erläutert.

#### Figur 1

zeigt, dass Ganglioside das Quervernetzen von GPI-verankerten Proteinen, insbesondere von GH-DAF in lebenden Zellen hemmen. MDCK GH-DAF-Zellen (MDCK: dog, Cocker Spaniel, kidney) wurden mit 0, 10, 50 und 100  $\mu$ M GM<sub>1</sub> (A) oder mit 10, 50 und 100  $\mu$ M bbG (B) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. CHO FR-GPI-Zellen wurden mit 100  $\mu$ M bbG oder mit 100  $\mu$ M GM<sub>1</sub> für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit

BS<sup>3</sup> quervernetzt. Die Proteine wurden mit 5 - 15 % SDS-PAGE getrennt und nach Western Blotten mit einem Anti-GH-Antikörper, gefolgt von ECL (Elektrochemolumineszenz) nachgewiesen. Die Autoradiographen wurden gescannt und die Intensität des immunoreaktiven Signals ist als relative optische Dichte (ROD) für 0  $\mu$ M GM<sub>1</sub> (A, obere Kurve), 0  $\mu$ M bbG (B, obere Kurve), 100  $\mu$ M GM<sub>1</sub> (A, untere Kurve) und 100  $\mu$ M bbG (B, untere Kurve) dargestellt.

### Figur 2

zeigt, dass Ganglioside das Quervernetzen von FR-GPI in CHO-Zellen hemmen. CHO FR-GPI-Zellen wurden mit 100  $\mu$ M bbG oder mit 100  $\mu$ M GM<sub>1</sub> für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit BS<sup>3</sup> quervernetzt. Die Proteine wurden mit 5 - 15 % SDS-PAGE getrennt und nach Western Blotten mit einem Anti-Folatrezeptor-Antikörper, gefolgt von ECL (Elektrochemolumineszenz) nachgewiesen.

### Figur 3

zeigt die Inkorporation von GM<sub>1</sub> in die Plasmamembran von MDCK GH-DAF-Zellen. In (A) wurden MDCK GH-DAF-Zellen mit 1  $\mu$ Ci/ml Tritium enthaltendem GM<sub>1</sub> bei einer Gangliosid-Endkonzentration von 100  $\mu$ M für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend mit BSA (Rinderserumalbumin) für 0, 10, 20, 30 oder 45 Minuten (schraffierte Balken) gewaschen. Die additive Wirkung einer Behandlung mit 0,1 % Trypsin für 5 Minuten bei 37°C nach dem Waschen mit BSA ist als ausgefüllte Balken gezeigt. In (B) wurde das Quervernetzen nach Inkubieren von GM<sub>1</sub>-beladenen Zellen mit BSA für 0, 10, 20, 30 oder 45 Minuten durchgeführt. SDS-PAGE, Western-Blotting und Nachweis wurden wie in Figur 1 beschrieben durchgeführt.

### Figur 4

zeigt den Anstieg der Detergenz-Solubilität von GH-DAF durch Ganglioside. In (A) wurden MDCK GH-DAF-Zellen mit 100  $\mu$ M bbG für 1 Stunde bei

37°C oder mit 100  $\mu$ M NBD-C<sub>6</sub>-HPC für 1 Stunde bei 8°C; mit 100  $\mu$ M GM<sub>1</sub> für 1 Stunde bei 37°C oder mit 100  $\mu$ M bbG für 1 Stunde beladen, gefolgt von einer 6stündigen Inkubation mit DMEM enthaltendem Serum (A) oder einer Behandlung mit 10 mM Methyl- $\beta$ -cyclodextrin für 1 Stunde bei 37°C oder einer Inkubation mit Anti-GH für 1 Stunde bei 12°C, gefolgt von einer Inkubation mit einem sekundären Antikörper (B). Die Zellen wurden mit Triton X-114 für 30 Minuten bei 4°C extrahiert, zentrifugiert und das GH-DAF in der löslichen (S) und unlöslichen (I) Fraktion wurde wie unten beschrieben nachgewiesen.

#### Figur 5

zeigt, dass die Wirkung von Octylglukosid auf Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen von der Wirkung von Gangliosiden verschieden ist. MDCK GH-DAF-Zellen wurden für 1 Stunde mit 5 und 10 mM Octylglukosid inkubiert und mit BS<sup>3</sup> quervernetzt. Eine leichte Abnahme der Quervernetzung wurde nur bei der Verwendung von 10 mM Octylglukosid beobachtet. Bei allen untersuchten Konzentrationen blieben die Membranen intakt.

#### Figur 6

zeigt, dass die Hemmung der Quervernetzung von GH-DAF eine spezifische Eigenschaft von Gangliosiden ist. In (A) wurden MDCK GH-DAF-Zellen mit 0, 10, 50 oder 100  $\mu$ M NBD-C<sub>6</sub>-HPC für 30 Minuten bei 8°C inkubiert, bevor sie mit BS<sup>3</sup> quervernetzt wurden. SDS-PAGE, Western-Blotting und Nachweis wurden wie in Figur 1 beschrieben durchgeführt. In (B) wurden MDCK GH-DAF-Zellen mit 0 oder 100  $\mu$ M bbG für 1 Stunde inkubiert, gefolgt von einer 6stündigen Inkubation mit einem Medium enthaltenden Serum (DMEM/FCS). Die Zellen wurden quervernetzt, gefolgt von SDS-PAGE, Western-Blotting und Nachweis, wie in Figur 1 ausgeführt.

#### Figur 7



zeigt, dass eine Gangliosidbehandlung das Immunofluoreszenzmuster von GH-DAF nicht verändert. MDCK GH-DAF-Zellen wurden ohne (A, D), mit 100  $\mu$ M bbG (B) bzw. mit 10 mM CD (C) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden fixiert und mit einem Anti-GH-Antikörper gefolgt von einem Cy3-konjugierten Anti-Schaf-IgG (A, B und C) markiert oder vor der Fixierung Antikörper-induziert quervernetzt.

#### Figur 8

zeigt, dass die Beladung von MDCK GH-DAF-Zellen mit Gangliosiden den Autophosphorylierungsstatus verändert. MDCK GH-DAF-Zellen wurden mit bbG oder GM<sub>1</sub> für 1 Stunde bei 37°C beladen oder mit 0,5 mM BS<sup>3</sup> für 45 Minuten bei 4°C quervernetzt. Nach einer Lyse wurden Aliquots der Proben auf einem 5 - 15 % Gel getrennt und es wurde der In-Gel-Assay für die Proteinkinaseaktivität durchgeführt. Banden, bei denen die Intensität bei der Gangliosidbehandlung anstieg, sind mit einem Pfeil markiert. Banden, die nur nach einer Gangliosidbeladung sichtbar wurden, sind mit einem Pfeilkopf markiert.

#### Figur 9

zeigt die Hemmung des Copatching von Influenza HA und GH-DAF durch Ganglioside. MDCK GH-DAF-Zellen wurden mit dem Influenza HA-Virus infiziert und dann mit DMEM (A-F) oder 100  $\mu$ M GM<sub>1</sub> in DMEM (G-L) für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach einer anschließenden Behandlung mit einem Gemisch von monoklonalen Anti-HA-Maus- und polyklonalen Anti-GH-Schaf-Antikörpern bei 4 °C wurde das Patching unter Verwendung von markierten sekundären Cy-3-Anti-Schaf (rot)- und FITC-Anti-Maus (grün)-Antikörpern nachgewiesen. Die Panels in der linken Spalte zeigen die Verteilung von GH, in der mittleren Spalte die Verteilung von HA und in der rechten Spalte die Kombination beider Signale. Die Panels D-F zeigen jeweils ein Detail der Panels A-C, wohingegen die Panels J-L ein Detail der Panels G-I zeigen. Die Striche in F und L entsprechen 2  $\mu$ M, die in C und I 8  $\mu$ M.

BeispieleBeispiel 1**Inhibition der Quervernetzung von GPI-verankerten Proteinen durch exogene Verabreichung von Gangliosiden**

5

Zur Analyse der Organisation von GPI-verankerten Proteinen auf der Oberfläche wurde eine MDCK-Zelllinie verwendet, die permanent GH, fusioniert an den GPI-Anker des Zerfallbeschleunigungsfaktors (GH-DAF; decay accelerating factor) exprimiert (Friedrichson et al., Nature 394 (1998), 802 - 805). Die MDCK GH-DAF-Zellen wurden bei 37°C in 5 % CO<sub>2</sub> in DMEM, ergänzt mit 10 % FCS und Antibiotika gelagert. Die Experimente wurden auf konfluenten oder subkonfluenten Zellen durchgeführt, die in Kunststoffschalen gezüchtet wurden. Wenn MDCK GH-DAF-Zellen chemisch mit Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS<sup>3</sup>) quervernetzt wurden, wurde eine deutliche Bande bei 46 kDa (Dimer) und eine verschmierte Bande, die von 60 kDa bis zu 300 kDa reichte, durch Western-Blotten nachgewiesen (Figur 1A).

Um den Einfluss von Gangliosiden auf Sphingolipid-Cholesterin-Flöße zu untersuchen, wurden MDCK GH-DAF-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von GM<sub>1</sub> für 1 Stunde in einem serumfreien Medium bei 37°C beladen und mit BS<sup>3</sup> quervernetzt. Wie man in Figur 1A sehen kann, verringerte eine Behandlung von MDCK GH-DAF-Zellen mit GM<sub>1</sub> die Menge an quervernetztem GH-DAF signifikant. Die Quantifizierung der immunoreaktiven Banden ergab, dass 73 % ± 6 % von GH-DAF Oligomere in unbehandelten Zellen bildete, während 65 % ± 7 %, 57 % ± 7 % und 49 % ± 7 % von GH-DAF in quervernetzten Spezies in Zellen gefunden, die mit 10, 50 bzw. 100 µM GM<sub>1</sub> behandelt wurden. Eine Inkubation der Zellen mit Rinderhirngangliosiden (bbG) inhibierte ebenfalls effizient die Bildung von GH-DAF-Oligomeren (Figur 1B). Bei der Verwendung von 100 µM bbG betrug die Quervernetzungseffizienz 51 % ± 5 %, verglichen mit 73 % ± 6 % in unbehandelten Zellen.

Um festzustellen, ob die Fähigkeit von Gangliosiden GPI-AP enthaltende Flöße aufzulösen, unabhängig vom Zelltyp ist, wurden CHO-Zellen, die permanent den GPI-verankerten Folatrezeptor (FR-GPI) exprimieren, in der gleichen Weise behandelt. Die CHO FR-GPI-Zellen wurden in einem Folatfreien Hams F-12-Medium gezüchtet, das 5 % FCS, Hygromycin (100  $\mu\text{g/ml}$ ), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100  $\mu\text{g/ml}$ ) enthielt. Das Quervernetzen von CHO FR-GPI-Zellen mit BS<sup>3</sup> führt zum Auftreten von quervernetzten Produkten von FR-GPI, wobei eine Quervernetzungseffizienz von 28 %  $\pm$  3 % beobachtet wurde. Wenn CHO FR-GPI-Zellen mit 100  $\mu\text{M}$  GM<sub>1</sub> oder 100  $\mu\text{M}$  bbG vor dem Quervernetzen beladen würden, wurde die Quervernetzungseffizienz auf 2,7 %  $\pm$  2,5 % bzw. 3,3 %  $\pm$  2 % verringert (siehe Figur 2).

Um die Menge an GM<sub>1</sub> zu quantifizieren, die in die Plasmamembran inkorporiert wird, wurden MDCK GH-DAF-Zellen mit 1  $\mu\text{Ci/ml}$  Tritium enthaltendem GM<sub>1</sub> bei einer Gangliosidkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  für 1 Stunde inkubiert. Hierzu wurde GM<sub>1</sub> extrahiert, gemäß bekannten Verfahren gereinigt (Tettamanti et al., Biochim. Biophys. Acta 296 (1973), 160 - 170) und am C-3 der Langkettenbasengruppe radiomarkiert (Sonnino et al., J. Lipid Res. 25 (1984), 620 - 629). Die Homogenität der radioaktiven Verbindung <sup>3</sup>H-GM<sub>1</sub> betrug über 99 % und ihre spezifische Radioaktivität betrug 1,31 Ci/mmol. Die Zellen wurden für 1 Stunde in DMEM, das 1  $\mu\text{Ci/ml}$  des Tritium enthaltenden GM<sub>1</sub> bei einer Gangliosidkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  enthielt, inkubiert, mit PBS/BSA gewaschen und anschließend für 0 bis 45 Minuten mit PBS/BSA bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann für 5 Minuten bei 37°C mit 1 ml PBS, das 0,1 % Trypsin enthielt, behandelt. Die Zelllysate wurden hinsichtlich des radioaktiven Gangliosidgehalts mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Beckmann Instruments, CA) analysiert. Das Protein wurde unter Verwendung eines Protein Assay Reagents (BCA; Pierce, UK) bestimmt.

- 16 -

Nur etwa 0,7 % des exogen zugegebenen Gangliosids assoziierte mit den Zellen. Etwa 35 % des gesamten assoziierten GM<sub>1</sub> konnte durch Inkubation der Zellen mit einer BSA-Lösung entfernt werden (Figur 3A). Durch eine nachfolgende Behandlung der Zellen mit Trypsin konnten zwei Pools von assoziiertem GM<sub>1</sub> nachgewiesen werden. Etwa 30 % des verbleibenden GM<sub>1</sub> wurde durch eine Trypsinbehandlung freigesetzt (Trypsin-labiler Pool) und etwa 70 % war beständig (Trypsin-stabiler Pool) (Figur 3A). Es wird angenommen, dass der Trypsin-stabile Pool von GM<sub>1</sub> den Molekülen entspricht, die in die Plasmamembran eingefügt sind, wohingegen der Trypsin-labile Pool aus Gangliosiden besteht, die mit Proteinen wechselwirken, die aus der Plasmamembran herausstehen (vgl. Masserini et al., *Biochemistry* 29 (1990), 697 - 701; Saqr et al., *J. Neurochem.* 61 (1993), 495 - 411). Der Trypsin-stabile Pool von GM<sub>1</sub> enthielt diejenige Fraktion angereichert, die gegenüber einer Extraktion mit Triton X-100 bei 4 °C beständig war. Nach einer Inkubation von Zellen mit 100 µM Tritium enthaltendem GM<sub>1</sub> wurden 3,74 nMol GM<sub>1</sub> (pro mg Protein) in der Detergenz-unlöslichen Fraktion gefunden, während 1,26 nMol GM<sub>1</sub> aus der löslichen Fraktion gewonnen wurden, was zeigt, dass sich exogenes GM<sub>1</sub> in den Flößen ansammelt.

Um auszuschließen, dass die Inhibition der Quervernetzung von GH-DAF aufgrund der Wirkung von lose mit der Oberfläche assoziierten Gangliosiden stattfindet, wurde das Quervernetzen an GM<sub>1</sub>-beladenen Zellen vor und nach der Inkubation mit BSA durchgeführt. Die Quervernetzungseffizienz blieb unter diesen zwei Bedingungen die gleiche (siehe Figur 3B, die Variation der Effizienz war kleiner als 5 % bei allen Bedingungen). Somit sind Ganglioside, die mit der Membran fest assoziiert sind, für die Inhibition der Quervernetzung verantwortlich. Es wurde festgestellt, dass 70 % des fest assoziierten GM<sub>1</sub> in die Doppelschicht inkorporiert wurden gemäß dem von anderen Autoren verwendeten Kriterium (Kanda et al., *J. Biochem. (Tokyo)* 91 (1982), 1707 - 1718; Schwarzmann et al., *Biochemistry* 22 (1983), 5041 - 5048). Der Anteil des Trypsin-labilen Pools am

Quervernetzen ist somit, falls er überhaupt auftritt, sehr gering, insbesondere da die Löslichkeit von GH-DAF in TX-114 durch Ganglioside beträchtlich erhöht wurde. Dieses Verhalten kann mit an hervorstechenden Proteine bindenden Gangliosidmicellen nicht erklärt werden.

5

### Beispiel 1A

#### **Zerbrechen von Cholesterin-reichen Mikrodomänen in MDCK-Zellen mit Cholesterinsulfat**

10 Cholesterinsulfat-methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD)-Einschlusskomplexe wurden im Wesentlichen wie von Klein et al. (1995), Biochemistry 34, S. 13784 beschrieben, hergestellt. 5 ml einer wässrigen M $\beta$ CD-Lösung (10 mg/ml) wurden konstant bei 60°C auf einem Wasserbad gerührt und es wurden 0,15 ml einer Cholesterinsulfat (CS)-Lösung (10 mg/ml in Isopropanol) in  
15 kleinen Portionen zugegeben. Die Lösung wurde für 10 Minuten bei 40°C ultraschallbehandelt, für 10 Minuten bei 100.000 g zentrifugiert und lyophilisiert. Der getrocknete Einschlusskomplex wurde schließlich in 300  $\mu$ l Wasser gelöst, um eine 10 mM Vorratslösung bezüglich Cholesterinsulfat zu ergeben. MDCK GH-DAF-Zellen ( $10^6$ ) wurden in eine 35 mm Kulturschale  
20 geimpft und die Zellen über Nacht zu hoher Dichte gezüchtet. Nach zweimaligem Spülen mit PBS wurden die Zellen mit Cholesterinsulfat-M $\beta$ CD-Einschlusskomplexen in DMEM für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit eiskaltem PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)/BSA (Rinderserumalbumin) (PBS enthaltend 2 mg/ml BSA) gewaschen, um  
25 Einschlusskomplexe zu entfernen und die Zellen wurden auf Eis für 5 Minuten gekühlt, bevor sie einem Quervernetzen unterzogen wurden. Routinemäßig wird beim Standardquervernetzungsprotokoll der membranimpermeable Quervernetzer bis-(Sulfosuccinimidyl)suberat (BS<sup>3</sup>) verdünnt auf 0,5 bis 1 mM in PBS verwendet. Zellen wurden mit einer BS<sup>3</sup>-  
30 Lösung für 45 Minuten bei 4°C inkubiert. Nicht umgesetztes Quervernetzungsmittel wurde mit 1 mM Glycin, gelöst in PBS für 15 min bei 4°C gequenchet. Anschließend wurden die Zellen mit einem Triton X-114

- 18 -

enthaltenden Puffer lysiert und es wurde eine Detergenz-reiche Phase hergestellt, um GPI-Ankerproteine anzureichern. Die Proteine wurden aus der Detergenz-reichen Phase präzipitiert, auf einem SDS-PAGE-Gradientengel aufgetrennt, auf Nitrocellulose geplottet und GH-DAF wurde mit Anti-GH-Antikörpern, HRP-konjugierten Sekundärantikörpern und ECL sichtbar gemacht.

Ähnlich wie bei der GM1-Behandlung war die Quervernetzung von GH-DAF signifikant vermindert.

### Beispiel 2

#### **Veränderung der Detergenz-Solubilität von GH-DAF durch Ganglioside**

Ein oftmals verwendetes Kriterium zur Untersuchung der Assoziation eines Proteins an Mikrodomänen ist seine Extraktionsbeständigkeit gegenüber nicht-ionischen Detergenzien, wie etwa Triton X-100 bei 4°C (Brown et al., Cell 68 (1992), 533 - 544). Es wurde deshalb die Detergenz-Solubilität von GH-DAF nach einer Gangliosidbeladung der Zellen untersucht. Es wurde gefunden, dass die Löslichkeit von GH-DAF in TX-114 signifikant von  $51 \pm 4 \%$  auf  $83 \pm 10 \%$  bzw.  $76 \pm 8 \%$  in mit GM<sub>1</sub> bzw. bbG beladenen Zellen erhöht wurde (Figur 4A).

Durch diese Ergebnisse wurde gezeigt, dass Ganglioside, die in die Plasmamembran eingefügt werden, GPI-APs aus Lipidmikrodomänen verdrängen. Eine Beeinflussung, insbesondere Hemmung der Quervernetzung durch sterische Hinderung durch Ganglioside, die an aus der Oberfläche der Plasmamembran hervorstehende Proteine gebunden sind, tritt somit nicht oder nur zu einem sehr geringen Teil auf. Es ist bekannt, dass eine Verringerung des Cholesterins in Zellmembranen die Löslichkeit von GPI-APs in nicht-ionischen Detergenzien erhöht (Cerneus et al., J. Biol. Chem. 268 (1993), 3150 - 3155; Hanada et al., J. Biol. Chem. 270 (1995), 6254 - 6260; Scheiffele et al., EMBO J. 16 (1997), 5501 - 5508). Die

Löslichkeit von GH-DAF wurde bei einer TX-114 Extraktion auf 80 %  $\pm$  7 % nach einer Extraktion des Membrancholesterins mit CD verschoben (Figur 4B). Im Gegensatz dazu verringert eine Stabilisierung der Mikrodomänen durch ein Antikörper-induziertes Quervernetzen die Solubilität von GH-DAF auf 34 %  $\pm$  7 % (Figur 4B).

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Modulation oder Veränderung des Lipidgehalts der zellulären Membran durch Verwendung von exogenen Gangliosiden sowohl das Clusterverhalten von GPI-APs als auch die Solubilisierung in TX-114 bei 4°C moduliert.

### Beispiel 3

#### **Wirkung von Gangliosiden auf Mikrodomänen**

Wie oben gezeigt wurde, werden GPI-APs durch Beladen von MDCK-GH-DAF-Zellen mit Gangliosiden aus den Flößen verdrängt. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass diese Wirkung teilweise aufgrund von detergenzartigen Eigenschaften von Gangliosiden auftreten, wurde n-Octyl- $\beta$ -D-glukopyranosid (OG) eingesetzt. Dieses Detergenz ähnelt chemisch den Gangliosiden (es enthält beispielsweise eine Kohlenhydrat-Kopfgruppe) und es ist bekannt, dass es GPI-APs vollständig solubilisiert, wenn es oberhalb der kritischen Mizellenkonzentration (20 - 25 mM) verwendet wird. MDCK GH-DAF-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von OG inkubiert und mit BS<sup>3</sup> quervernetzt. Unter Verwendung der gleichen Konzentrationen von OG wie von den Gangliosiden (10 - 100  $\mu$ M) wurde kein Einfluss auf das Quervernetzen von GH-DAF beobachtet. Selbst wenn Zellen mit einer 100fach höheren Konzentration an OG (10 mM) inkubiert wurden, wurde nur eine geringfügige Inhibition der Quervernetzung beobachtet (Figur 5; die Inhibition betrug 3,5 %  $\pm$  0,7 %). Bemerkenswerterweise blieben selbst unter dieser Bedingung die Membranen intakt, da Caveolin-1, ein Proteinmembran, das sowohl N- als auch C-Termini zum Cytoplasma hin angeordnet aufweist, nicht quervernetzt wurde. Nur wenn OG oberhalb

- 20 -

seiner kritischen Mizellkonzentration (20 mM) verwendet wurde, wurde Caveolin-1 als quervernetztes Produkt mit hohem Molekulargewicht gefunden. Die Behandlung der MDCK GH-DAF-Zellen mit 100  $\mu$ M GM<sub>1</sub> führte nicht zum Quervernetzen von Caveolin-1. Diese Daten zeigen, dass die Inhibition der Quervernetzung von GH-DAF durch Ganglioside nicht aufgrund einer Solubilisierung der Membran durch detergenzartige Eigenschaften der Ganglioside auftritt.

#### Beispiel 4

##### **Inhibition der Quervernetzung von GH-DAF mit Gangliosiden**

In diesem Beispiel wird gezeigt, dass die Inhibition des Clusters von GPI-verankerten Proteinen eine spezifische Eigenschaft von Gangliosiden ist. Ein Lipid, das kein Bestandteil der Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen ist, sollte keinen Einfluss auf das Quervernetzen und die Löslichkeit von GH-DAF zeigen. Günstigerweise sollten für einen solchen Kontrollversuch Phosphatidylcholinmoleküle verwendet werden, wie etwa solche die in Zellmembranen vorkommen. Diese Lipide können jedoch nicht durch exogene Zugabe in die Membran eingebracht werden. Für diesen Zweck wurden deshalb MDCK GH-DAF-Zellen mit einem partiell wasserlöslichen fluoreszenzmarkierten Analogon von Phosphatidylcholin (NBD-C<sub>6</sub>-HPC) inkubiert. Es ist bekannt, dass NBD-C<sub>6</sub>-Lipide bei geringer Temperatur schnell zur Plasmamembran gelangen und ihre Akkumulation in der Plasmamembran kann durch Immunofluoreszenzmikroskopie leicht beobachtet werden (Kean et al., J. Cell. Biol. 123 (1993), 1403 - 1419). Es wurde nun die Detergenzunlöslichkeit von NBD-C<sub>6</sub>-HPC untersucht. Zellen wurden mit NBD-C<sub>6</sub>-HPC beladen und es wurde eine Detergenzextraktion bei 4°C mit Triton X-114 durchgeführt. Mehr als 99 % des NBD-C<sub>6</sub>-HPC wurde aus der Detergenz-löslichen Fraktion gewonnen, was anzeigt, dass das Lipid nicht mit den Mikrodomänen assoziiert vorliegt. Es wurde keine Veränderung im Quervernetzungsmuster nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an NBD-C<sub>6</sub>-HPC beobachtet. Die Quervernetzungseffizienz



- 21 -

betrug  $73 \% \pm 5 \%$  in mit  $100 \mu\text{M}$  NBD- $\text{C}_6\text{-HPC}$  behandelten Zellen im Vergleich zu  $73 \% \pm 6 \%$  in Kontrollzellen (Figur 6A). Auch die Löslichkeit von GH-DAF ( $54 \% \pm 2 \%$  löslich) wurde durch NBD- $\text{C}_6\text{-HPC}$  nicht verändert (Figur 4A).

5

Um festzustellen, ob die Hemmung der Quervernetzung von GH-DAF durch Ganglioside reversibel ist, wurden MDCK GH-DAF-Zellen mit  $100 \mu\text{M}$  bbG beladen und anschließend für 6 Stunden in einem Serum enthaltenden Medium vor dem Quervernetzen inkubiert. Wie in Figur 6B gezeigt, waren  
10 6 Stunden Inkubation mit einem Serum enthaltenden Medium ausreichend, um nahezu vollständig das Quervernetzungsmuster von GH-DAF wieder herzustellen. Die Quervernetzungseffizienz war  $6 \% \pm 1 \%$  geringer als bei Kontrollzellen.

15

Die Detergenzunlöslichkeit von GH-DAF in TX-114 wurde durch Inkubation von bbG-beladenen Zellen mit einem Serum enthaltenden Medium für 6 Stunden ebenfalls wieder hergestellt ( $61 \% \pm 4 \%$  löslich) (Figur 4A).

20

Dieses Beispiel zeigt, dass die Inhibition der Quervernetzung von GH-DAF mit Gangliosiden spezifisch und reversibel ist.

### Beispiel 5

#### **Die Verteilung von GH-DAF wird durch Ganglioside nicht verändert**

25

Bei Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen oder Flößen handelt es sich um kleine und hochdynamische Strukturen, die durch herkömmliche mikroskopische Techniken nicht aufgelöst werden können. Es wurde untersucht, ob ein Beladen der Zellen mit Gangliosiden zu einer globalen Umordnung der Plasmamembran und somit der GPI-APs führt. Die  
30 Verteilung von GH-DAF auf MDCK-Zellen mit oder ohne Beladung mit bbG wurde durch Immunofluoreszenzmarkierung analysiert. Um eine Umverteilung von GH-DAF nach der Fixierung zu verhindern, wurde eine

Formaldehydfixierung kombiniert mit einer anschließenden Methanolfixierung verwendet (Harder et al., J. Cell Biol. 141 (1998), 929 - 942). Die Inkubation der Zellen mit 100  $\mu$ M bbG für 1 Stunde vor der Fixierung und die Antikörpermarkierung hatten keinen Einfluss auf die diffuse Verteilung von GH-DAF auf der Zelloberfläche (Figur 7A und B). Die intrazelluläre Färbung stammt von der Anordnung des Proteins im Golgi und/oder der endosomalen Anordnung. Eine Verringerung des Membrancholesterins mit 10 mM CD führte ebenfalls nicht zu nachweisbaren Veränderungen in der Verteilung von GH-DAF (Figur 7C). Im Vergleich hierzu führte die Zugabe von Antikörpern gegen GH-DAF vor der Fixierung zu einer fleckenartigen Verteilung des Immunofluoreszenzsignals (Figur 7D). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Inhibition der Quervernetzung durch Ganglioside nicht aufgrund einer Umlagerung der Membran auftritt.

#### **Beispiel 6**

#### **Beladen der Zellen mit Gangliosiden verändert den Autophosphorylierungszustand von Proteinkinasen**

Dieses Beispiel zeigt, dass eine Korrelation zwischen der Verabreichung von Gangliosiden zu MDCK GH-DAF-Zellen und Zellsignalübertragungsvorgängen besteht. Als Anzeige einer Signalübertragung wurde der Autophosphorylierungszustand von Zellproteinkinasen nach einer Gangliosidbeladung von Zellen unter Verwendung eines In-Gel-Assays gemessen. Die Bedingungen für die Gangliosidbeladung waren die gleichen wie für die Untersuchungen zur Quervernetzung. Wie man aus Figur 8 sehen kann, stieg nach Zugabe von Gangliosiden die Intensität von verschiedenen Banden signifikant an (Pfeil), während andere Banden nur nach einer Gangliosidbehandlung sichtbar wurden (Pfeilköpfe). Hier ist zu beachten, dass ein chemischen Quervernetzen mit BS<sup>3</sup> alleine nicht zu signifikanten Veränderungen des Autophosphorylierungszustands führt. Diese Versuche zeigen, dass Ganglioside neben einer Modulation der

Assoziation von GPI-verankerten Proteinen an Mikrodomänen  
Signalübertragungsvorgänge in MDCK-Zellen induzieren können.

### Beispiel 7

#### 5 Inhibition des Copatching von Influenza HA und GH-DAF durch Ganglioside

Bei Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen handelt es sich um kleine und  
hochdynamische Strukturen, die durch herkömmliche mikroskopische  
Techniken nicht aufgelöst werden können. Es wurde untersucht, ob ein  
10 Beladen der Zellen mit Gangliosiden zu einer Umverteilung von GPI-APs  
führt. Die Verteilung von GH-DAF auf MDCK-Zellen mit oder ohne Beladung  
mit bbG wurde durch Immunofluoreszenzmarkierung analysiert. Um eine  
Umverteilung von GH-DAF nach der Fixierung zu verhindern, wurde eine  
Formaldehydfixierung kombiniert mit einer anschließenden Methanolfixierung  
15 verwendet (Harder et al., J. Cell. Biol. 141 (1998) 929-942). Die Inkubation  
der Zellen mit 100  $\mu$ M bbG für 1 Stunde vor der Fixierung und die  
Antikörpermarkierung hatten keinen Einfluss auf die diffuse Verteilung von  
GH-DAF auf der Zelloberfläche (Figur 8, Panelen A und B). Die intrazelluläre  
Färbung stammt von der Anordnung des Proteins im Goigi und/oder der  
20 endosomalen Anordnung. Eine Verringerung des Membrancholesterins mit  
10 mM CD führte ebenfalls nicht zu nachweisbaren Veränderungen in der  
Verteilung von GH-DAF (Figur 7 C). Im Vergleich dazu führte die Zugabe  
von Antikörpern gegen GH-DAF vor der Fixierung zu einer Patch-artigen  
Verteilung des Immunofluoreszenzsignals (Figur 7 D).

25

Das gleichzeitige Inkubieren von lebenden Zellen mit Antikörpern gegen mit  
den Mikrodomänen assoziierten Proteinen führt zur Umverteilung der  
unabhängig quervernetzten Komponenten in überlappende Patches. Ein  
Copatching wird aber nur für Floßmarker-Paare beobachtet, nicht für Paare  
30 bestehend aus einem Floß-Marker und einem nicht-Floß-Marker, woraus  
man schließen kann, daß Anziehungskräfte in der gemeinsamen  
Lipidumgebung von Floß-Proteinen vorhanden sind.

Es wurde nun untersucht, ob die exogene Verabreichung von Gangliosiden die physikalische Verbindung von GH-DAF an Lipidmikrodomänen stört. Als einen mit den Mikrodomänen assoziierten Proteinmarker wurde das trimere Transmembranprotein Influenza Hämagglutinin (HA) in MDCK GH-DAF-Zellen exprimiert.

Die Zellen wurden gleichzeitig mit einem monoklonalen Anti-HA mAb und einem polyklonalen Anti-GH Ab bei 4 °C inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit den jeweiligen sekundären Antikörpern. Eine Mikroskopanalyse zeigte ein Copatching von HA und GH-DAF in der Hauptzahl der Zellen (60 % Copatching, 35 % teilweise Überlappung und 5 % zufällige Verteilung) (Figur 9A-F). Wenn die Zellen für 1 Stunde mit 100  $\mu$ M GM<sub>1</sub> vor dem Antikörper-induzierten Quervernetzen inkubiert wurden, wurde in den meisten Zellen nur ein partielles Coclustern von HA und GH-DAF beobachtet (31 % Coclustern, 50 % teilweise Überlappung und 19 % zufällige Verteilung) (Figur 9 G-L). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Anziehungskräfte zwischen Patches von HA und GH-DAF durch Verabreichung von Gangliosiden gestört werden, was zeigt, dass GPI-APs aus den Lipidmikrodomänen verdrängt werden.

### Beispiel 8

#### **Experimentelle Vorgehensweisen**

In den vorstehenden Beispielen wurden die folgenden Vorgehensweisen verwendet:

#### **Insertion von Lipiden, Verringerung des Cholesteringehalts und Octylglukosidbehandlung von Zellen:**

Vorratslösungen von Rinderhirngangliosiden (bbG) oder GM<sub>1</sub> (1 - 10 mM) wurden in PBS hergestellt. Die Zellen wurden mit 10 - 100  $\mu$ M Gangliosiden in DMEM für 1 Stunde bei 37°C beladen (Masserini et al., Biochemistry 29 (1990), 697 - 701; Saqr et al., J. Neurochem. 61 (1993), 395 - 411). Um

überschüssiges Lipid zu entfernen, wurden Zellen gründlich mit PBS gewaschen, das 2 mg/ml entfettetes BSA (PBS/BSA) enthielt. Eine ethanolische 0,5 %ige Vorratslösung von 2-(6-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)hexanoyl-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (NBD-C<sub>6</sub>-HPC) wurde unter heftigem Vortexen in PBS injiziert, um eine 1 mM Lösung zu ergeben. Die Insertion von NBD-C<sub>6</sub>-HPC in Membranen wurde mit 10 - 100 µM NBD-C<sub>6</sub>-HPC für 1 Stunde bei 8°C durchgeführt. Um MDCK GH-DAF-Zellen von Cholesterin zu befreien, wurden sie für 1 Stunde bei 37°C mit 10 mM Methyl-β-cyclodextrin (CD) inkubiert. Für die Octylglukosidbehandlung wurden MDCK GH-DAF-Zellen für 1 Stunde bei 37°C mit verschiedenen Konzentrationen an in DMEM gelöstem Octylglukosid inkubiert.

#### **Detergenzextraktion:**

Die Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen und mit 1 ml TX-114-Lysepuffer bei 4°C für 30 Minuten extrahiert. Die Zellen wurden abgeschabt und Proben für 30 Minuten bei 15.000 g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand (lösliche Fraktion) wurde entfernt, das Pellet (unlösliche Fraktion) wurde in 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Lösliche und unlösliche Fraktionen wurden mit 10 % TCA für 1 Stunde auf Eis präzipitiert und für 15 Minuten mit 15.000 g bei 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden mit Aceton (-20°C) gewaschen und mit SDS-PAGE und Western Blotting weiter verarbeitet.

#### **Quervernetzen, Elektrophorese und Western Blotting:**

Das Quervernetzungsprotokoll wurde, wie kürzlich beschrieben, verwendet (Friedrichson et al., Nature 394 (1998), 802 - 805). Kurz, Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Das Quervernetzen wurde mit 0,5 mM BS<sup>3</sup> für 45 Minuten bei 4°C durchgeführt. Nicht umgesetzter Quervernetzer wurde mit 50 mM Glycin für 15 Minuten bei 4°C gequentscht. Die Zellen wurden 20 Minuten bei 4°C und 10 Minuten bei 37°C in einem TX-114-Lysepuffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 % Triton-X-114 und Proteaseinhibitoren) lysiert. Die Lysate wurden kurz auf

Eis gekühlt und durch eine 15minütige Zentrifugation bei 15.000 g geklärt. Die Überstände wurden einer temperaturinduzierten Phasenseparation für 5 Minuten bei 37°C unterzogen. Wässrige und Detergenz-angereicherte Phasen wurden durch Zentrifugation für 3 Minuten mit 13.000 U/min bei Raumtemperatur (RT) getrennt. Die wässrigen Phasen wurden verworfen und 0,9 ml TX-114 Waschpuffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,06 % Triton-X-114 und Proteaseinhibitoren) wurden den Detergenzphasen zugegeben. Nach einer 15minütigen Zentrifugation mit 15.000 g bei 4°C wurden die Proben einer weiteren Phasenseparation unterzogen. Schließlich wurden die Detergenzphasen mit kaltem Aceton (-20°C) präzipitiert und bei 95°C für 5 Minuten in einem Lämmli-Probepuffer gekocht. Die Proteine wurden mit einer 5 - 15 % SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose überführt. Polyklonale Antikörper gegen GH und den Folatrezeptor gefolgt von den entsprechenden sekundären Antikörpern und ECL wurden verwendet, um GH-DAF und FR-GPI nachzuweisen. Immunreaktive Banden wurden durch densitometrisches Scannen von Filmen oder einen Lumineszenz-Image-Analysator LAS-1000 (Fujifilm, Deutschland) quantifiziert. Die Daten für jede Bedingung wurden gemittelt und die Veränderung als Standardabweichung ausgedrückt. Die Experimente wurden 3 bis 6 mal durchgeführt. Für einige Gelen wurden die entsprechenden Röntgenstrahlfilme unter Verwendung einer Fotoshop-Software gescannt und die optische Dichte der immunoreaktiven Banden wurde bestimmt und unter Verwendung von MacBas (Version 2.0) ausgedruckt.

#### **Immunofluoreszenz:**

Auf Deckgläsern gezüchtete Zellen wurden 3 mal mit PBS gewaschen und für 6 Minuten mit 3,7 % Paraformaldehyd in PBS bei 8°C und für 10 Minuten mit Methanol bei -20°C fixiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit einem Anti-GH-Antikörper in PBS inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit Cy3-konjugiertem Anti-Schaf-IgG für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach jeder der obigen Inkubationen

wurden drei Waschschritte mit PBS durchgeführt. Die Deckgläser wurden in Moviol eingebettet und es wurden Abbildungen mit einer hochauflösenden Digitalkamera C 4742-95 (Hamamatsu Photonics K.K., Japan) aufgenommen und die digitale Dekonvolution wurde unter Verwendung der digitalen konfokalen Routine Openlab (Version 1.7.7) (Improvision, UK) durchgeführt.

Für die Antikörper-induzierten Quervernetzungsexperimente wurden der Anti-GH-Antikörper und das Cy3-konjugierte Anti-Schaf-IgG in DMEM verdünnt. Die Zellen wurden für 20 Minuten bei 37°C mit dem Anti-GH-Antikörper inkubiert, mit DMEM gewaschen und für 20 Minuten bei 37°C mit Cy3-konjugiertem Anti-Schaf-IgG inkubiert. Die Zellen wurden fixiert und wie oben beschrieben in Moviol eingebettet.

#### **In-Gel-Proteinkinase-Assay:**

In Schalen mit 6 Vertiefungen gezüchtete Zellen wurden mit Gangliosiden beladen oder mit BS<sup>3</sup>, wie oben beschrieben, quervernetzt, auf Eis gekühlt, 3 mal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 400 µl Lysepuffer (20 mM Tris-Acetat, pH 7,0, 0,1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Natriumorthovanadat, 10 mM β-Glycerophosphat, 50 mM Natriumfluorid, 5 mM Natriumpyrophosphat, 1 % TX-100, 1 mM Benzamidin, 2 µg/ml Leupeptin, 0,1 % β-Mercaptoethanol, 0,27 M Sucrose und 0,2 mM PMSF) für 30 Minuten bei 4°C lysiert und mit einem Gummiwischer abgekratzt. Die Lysate wurden für 15 Minuten bei 15.000 g geklärt und Aliquots wurden mit 5 x Probepuffer für 5 Minuten bei 95°C gekocht. Die Proben wurden auf 5 - 15 % Gelen, die mit 5 mg/ml BSA polymerisiert waren, aufgetrennt. Der In-Gel-Proteinkinase-Assay wurde gemäß dem von van Dam beschriebenen Verfahren durchgeführt (van Dam et al., EMBO J. 14 (1995), 1798 - 1811), außer dass 65 µCi γ-<sup>32</sup>P-ATP in 3 ml Puffer K pro Gel verwendet wurden.

**Virale Infektion und Antikörper-induziertes Patching:**

Für eine Infektion mit dem HA-Influenza-Virus wurde das Virus in einem Infektionsmedium (MEM, 50 mM Hepes, pH 7,3, Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml), 0,2 % BSA) verdünnt und es wurde für 1  
5 Stunde eine Virusadsorption durchgeführt. Die Infektion wurde weitere 2,5 Stunden fortgesetzt. 100 µM GM<sub>1</sub>, verdünnt in DMEM, wurden zu einigen Zellen während der letzten Stunde zugegeben. Für ein Antikörper-induziertes Patching von HA und GH-DAF wurden die Zellen mit einem polyklonalen Anti-GH-Antikörper und einem monoklonalen Anti-HA-PR8 (H17L10),  
10 verdünnt 1:3000 bzw. 1:50 in DMEM inkubiert. Die Inkubation wurde für 1 Stunde bei 4 °C durchgeführt. Nach einem kurzen Waschen mit PBS/0,2 % BSA wurden die Zellen mit den entsprechenden FITC und Cy-3-gekoppelten sekundären Antikörpern für 1 Stunde bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden fixiert, eingebettet und Abbildungen wie oben beschrieben  
15 genommen. Für die Quantifizierung wurden 60 zufällig ausgewählte Zellen aus zwei verschiedenen Experimenten als digitale Abbildungen gespeichert. Die Zellen wurden in drei verschiedene Kategorien gemäß dem Ausmaß der Überlappung zwischen den Patches eingeteilt: (1) Coclustern (mehr als 70 % Überlappung); (2) teilweises Coclustern; (3) zufällige Verteilung.

20

Die Erfindung betrifft somit insbesondere die Verwendung von Gangliosiden und anderen Substanzen zur Modulation von Sphingolipid-Cholesterin-Microdomänen. Sie kann z.B. zur Entwicklung von Wirkstoffen eingesetzt werden, die den Membrantransport, die Signalübertragung, die Zelladhäsion  
25 oder/und enzymatische Vorgänge in Säugerzellen beeinflussen. Die Modulation kann auch den Eintritt von Bakterien, Pathogenen und Viren in die Zellen verhindern.



## Patentansprüche

1. Verwendung von Gangliosiden, Gangliosidderivaten oder/und Cholesterinderivaten zur Herstellung eines Mittels zur Modulation von Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen.  
5
2. Verwendung nach Anspruch 1,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass das Mittel die Lokalisierung von Komponenten und deren Funktion auf den Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen beeinflusst.  
10
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass das Mittel die Lokalisierung von Proteinen auf den Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen beeinflusst.  
15
4. Verwendung nach Anspruch 3,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass das Mittel die Lokalisierung von Ankerproteinen, acylierten Proteinen, Src-Kinasen oder/und Cholesterin-verankerten Proteinen und anderen Raftproteinen beeinflusst.  
20
5. Verwendung nach Anspruch 3 oder 4,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass das Mittel auf Glykosyl-Phosphatidylinositol-Ankerproteine, Kinasen der Familie Src, Influenza Virus Hämagglutinin und andere Virusproteine oder/und Caveolin-1, 2 oder 3 in der Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomäne wirkt.  
25
6. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass das Mittel einen Clusterabbau der Proteine bewirkt.  
30

7. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass das Gangliosid ausgewählt wird aus Rinderhirngangliosiden, GM<sub>1</sub>,  
GD1a, GD1b, GD3, GM2, GM3, GQ1a, GQ1b oder/und Globosiden  
5 und deren Derivaten, insbesondere ungesättigten Sphingosinen oder  
Ceramiden mit ungesättigten oder kurzen Fettsäuren.
8. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
10 dass Cholesterinderivate, insbesondere Cholesterinsulfat, eingesetzt  
werden.
9. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
15 dass die Modulation der Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen eine  
Veränderung der Membrantransport-, Signalübertragungs- und/oder  
Zelladhäsionseigenschaften oder/und von enzymatischen Prozessen  
bewirkt.
- 20 10. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass die Modulation der Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen eine  
Veränderung der Proteolyse des Amyloidvorläuferproteins der  
Alzheimer Erkrankung oder eine Modifikation eines Prionproteins  
25 bewirkt.
11. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass die Modulation der Phingolipid-Cholestesrin-Mikrodomänen die  
30 Phagozytose von Bakterien und Parasiten in Säugerzellen verhindert.
12. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

**dadurch gekennzeichnet,**

dass die Modulation der Phingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen die Aufnahme von Viren in Säugerzellen oder/und deren Transport und Freisetzung verhindert.

5

13. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

**dadurch gekennzeichnet,**

dass das Mittel als Therapeutikum eingesetzt wird.

10

14. Verwendung von Gangliosiden, Galgiosidderivaten oder/und Cholesterinderivaten zur Modulation von Shingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen.

15

15. Verfahren zur Modulation von Shingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen, wobei einem Patienten Ganglioside, Gangliosidderivate oder/und Cholesterinderivate in einer Dosis von 3 mg bis 30 mg pro kg pro Tag verabreicht werden.



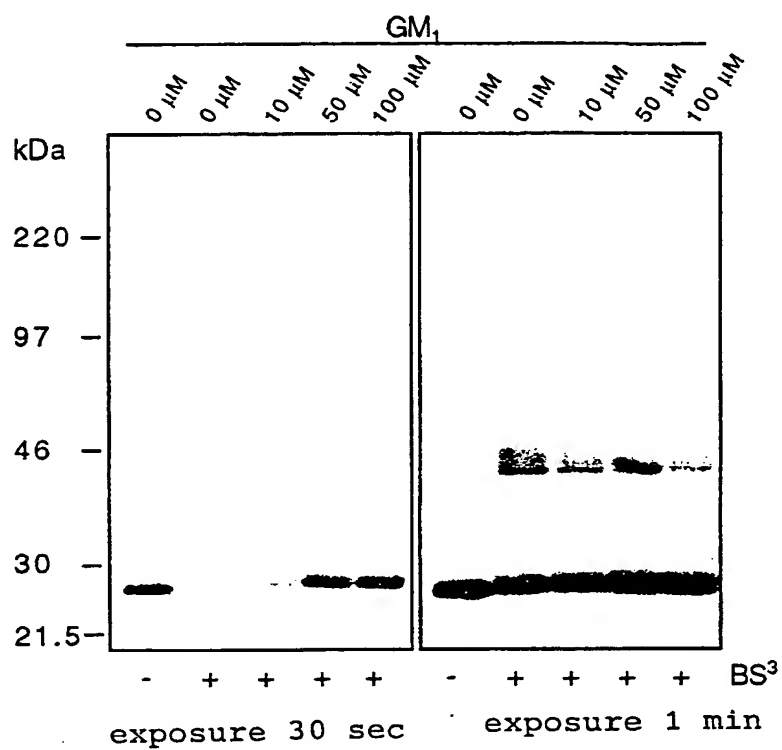
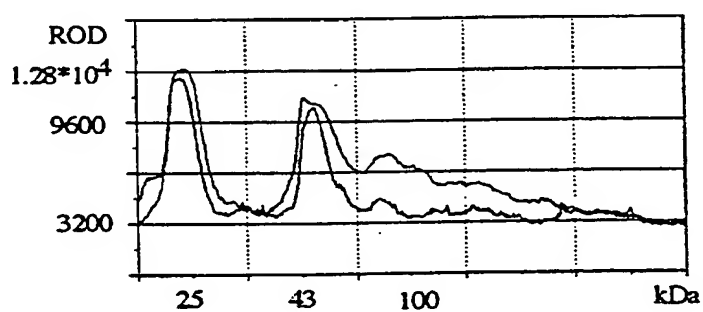


Fig. 1A





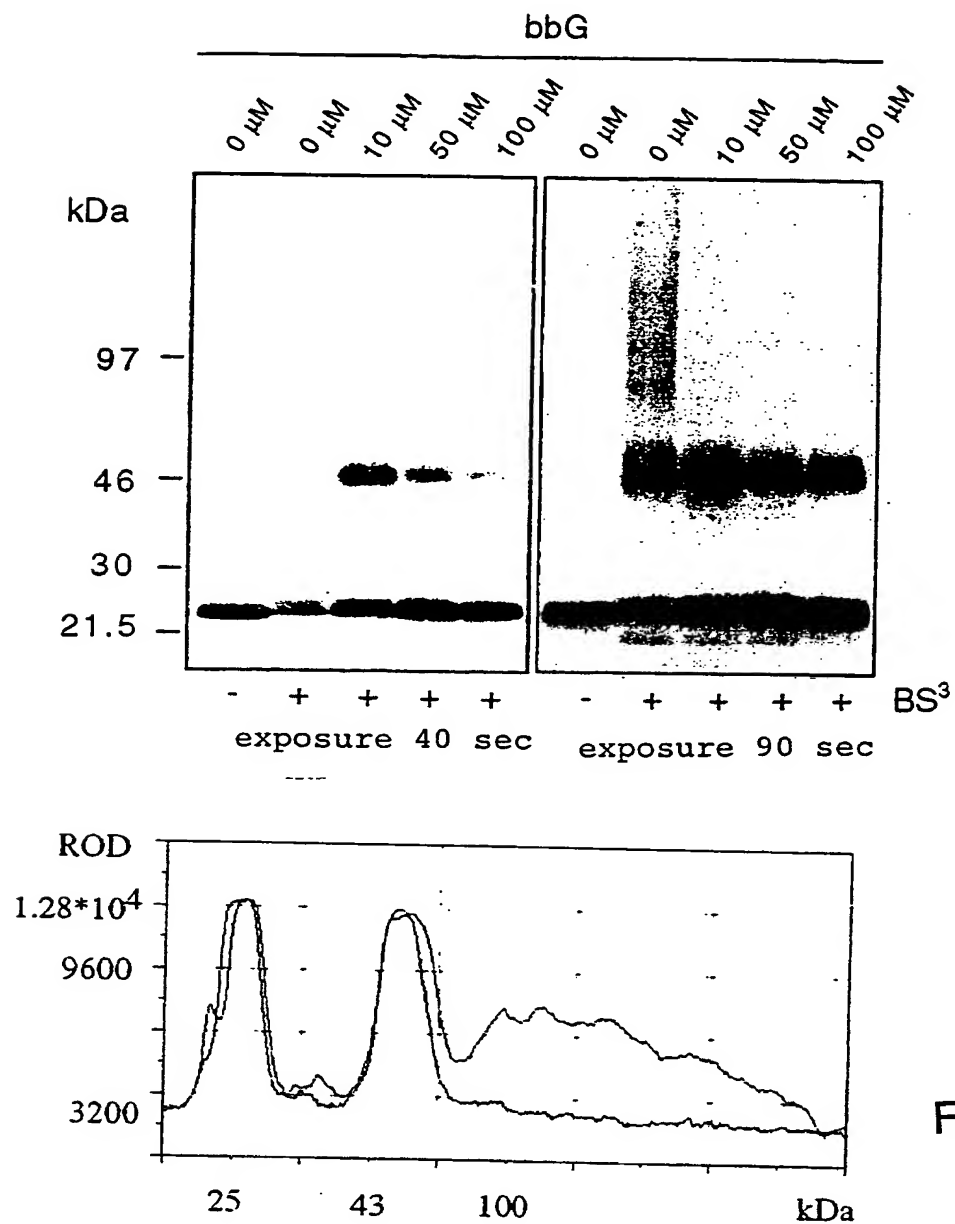


Fig. 1B





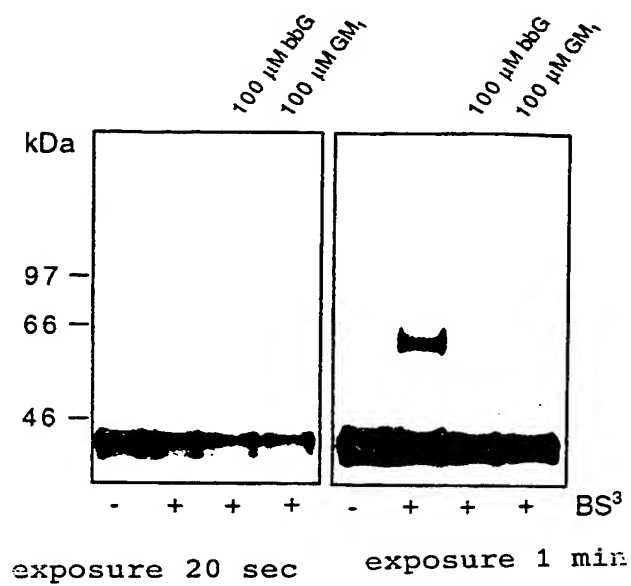


Fig. 2

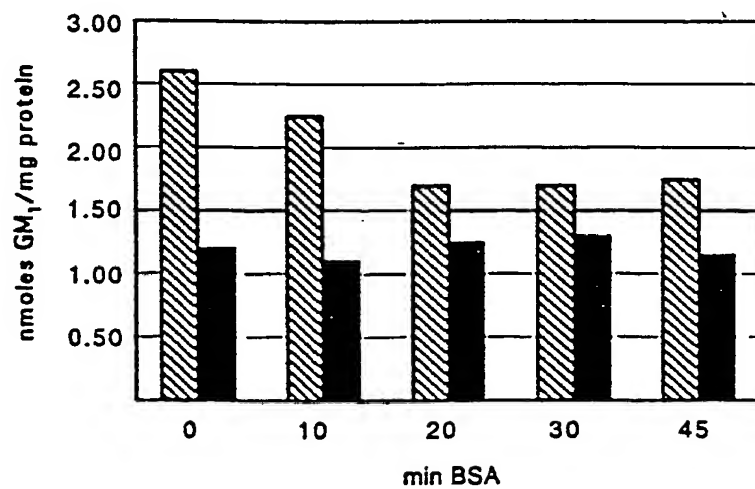


Fig. 3A

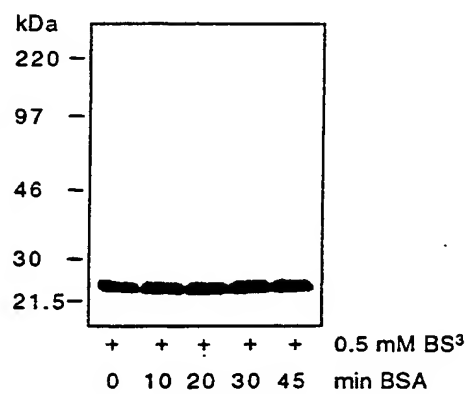


Fig. 3B



A

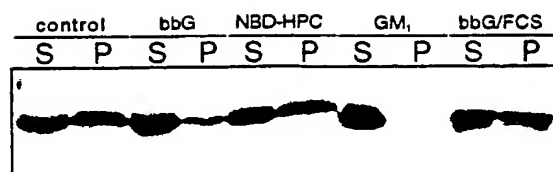


Fig. 4A

B

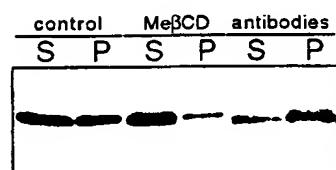


Fig. 4B

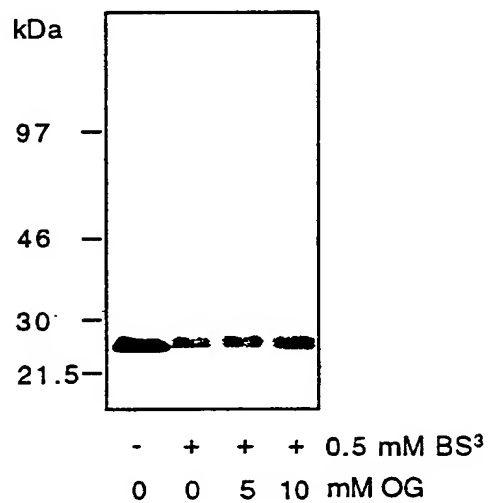


Fig. 5



Fig. 6A

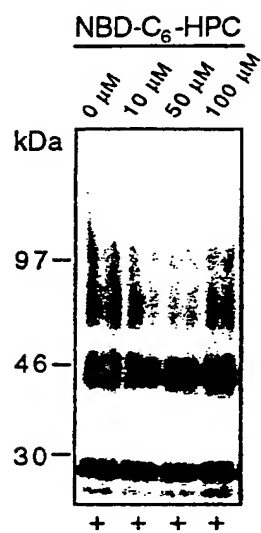


Fig. 6B

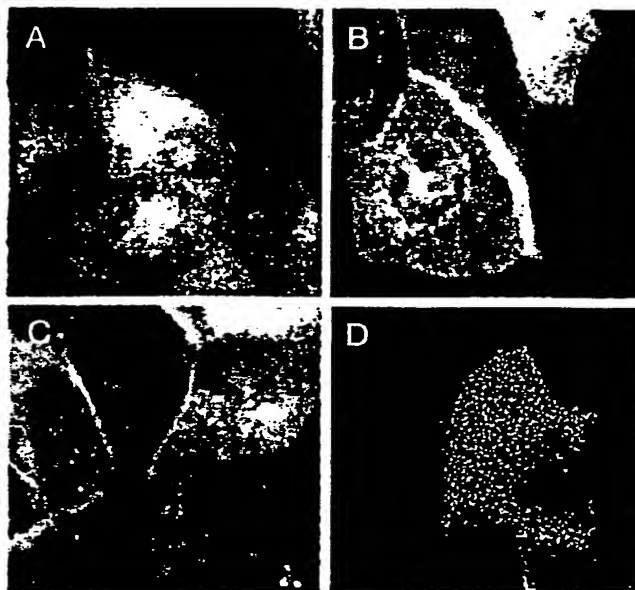
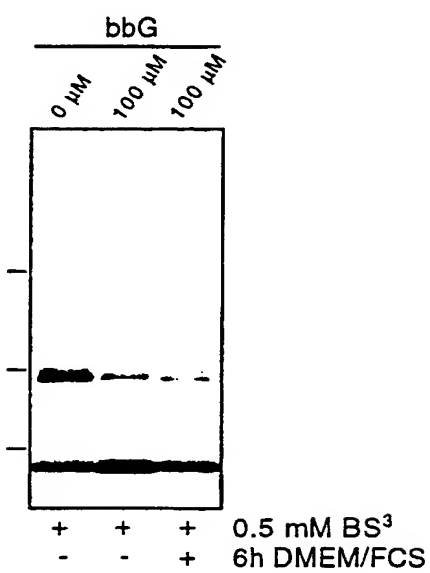


Fig. 7



4

5

6

7

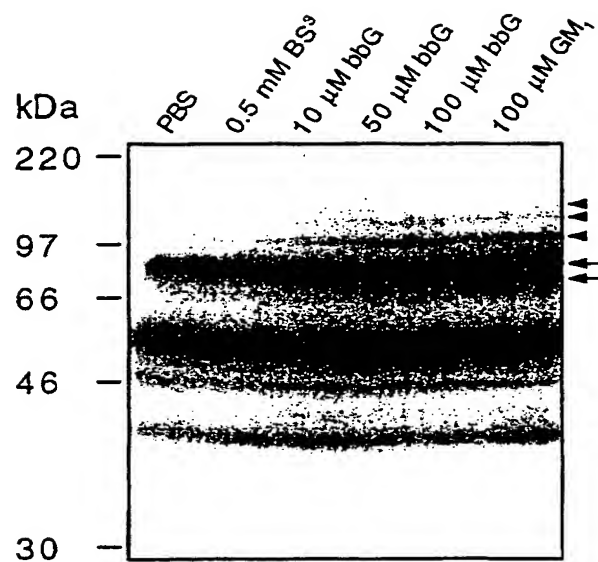


Fig. 8





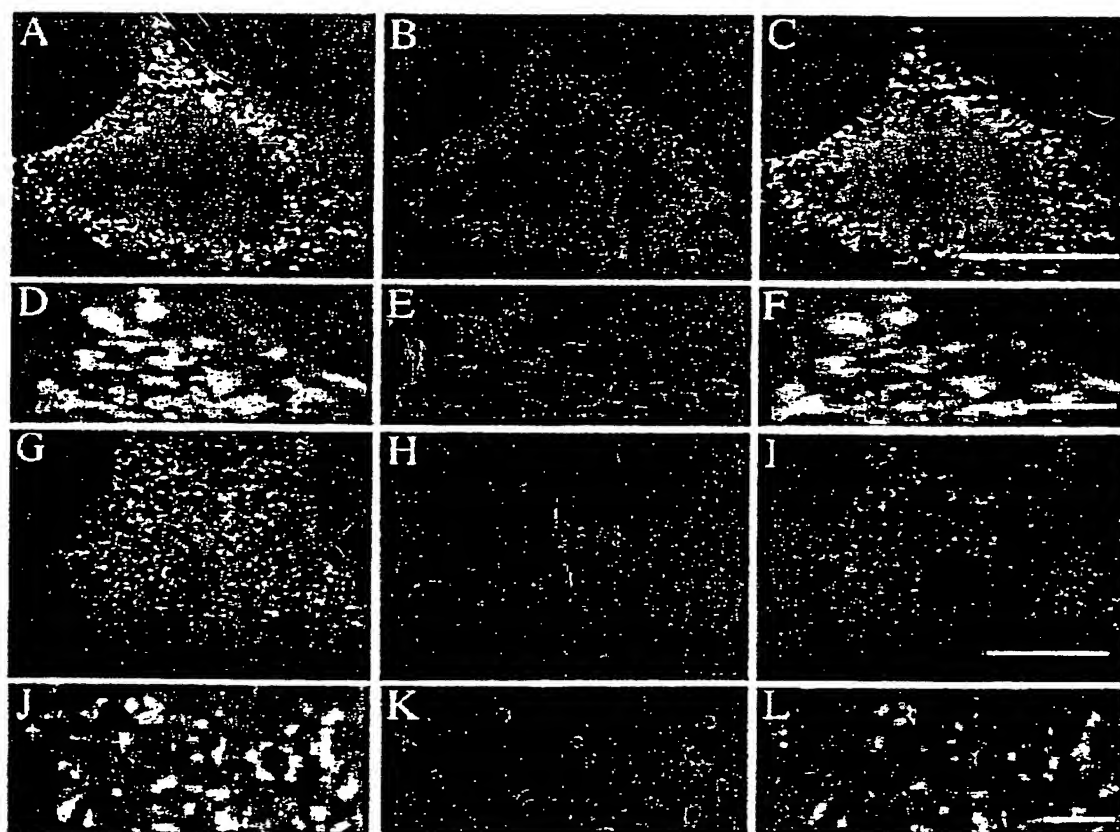


Fig. 9



1

2

3

4

10/089521  
(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
5. April 2001 (05.04.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/22957 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 31/70.**  
31/575

32. 10559 Berlin (DE). **SIMONS, Kai** [FI/DE];  
Kleinschmidtstrasse 27/1. 69115 Heidelberg (DE).  
**KURZCHALIA, Teymuras** [GE/DE]; Fehrbelliner  
Strasse 97. 10119 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/09588

(22) Internationales Anmeldedatum:  
29. September 2000 (29.09.2000)

(74) Anwälte: **WEICKMANN, H.** usw.: Kopernikusstrasse 9.  
81679 München (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): CA, JP, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,  
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, SE).

(30) Angaben zur Priorität:  
199 46 737.4 29. September 1999 (29.09.1999) DE

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): **MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR  
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.**  
[DE/DE]; Hofgartenstrasse 8. 80539 München (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 27. Juni 2002

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **SIMONS, Mikael**  
[FI/DE]; Amselweg 48. 72076 Tübingen (DE).  
**FRIEDRICHSON, Tim** [DE/DE]; Rathenower Strasse

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

WO 01/22957 A3  
(54) Title: USE OF GANGLIOSIDES AND OTHER SUBSTANCES FOR MODULATING SPHINGOLIPID-CHOLESTEROL  
MICRODOMAINS

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON GANGLIOSIDEN UND ANDEREN SUBSTANZEN ZUR MODULATION VON  
SPHINGOLIPID-CHOLESTERIN-MIKRODOMÄNEN

(57) Abstract: The invention relates to the use of gangliosides and other substances for producing an agent for modulating sphin-  
golipid-cholesterol microdomains.

(57) Zusammenfassung: Es wird die Verwendung von Gangliosiden und anderen Substanzen zur Herstellung eines Mittels zur  
Modulation von Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen beschrieben.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/09588

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K31/70 A61K31/575

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, PHARMAPROJECTS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 016, no. 272 (P-1373), 18 June 1992 (1992-06-18) & JP 04 070558 A (YAMAGUCHIKEN), 5 March 1992 (1992-03-05) abstract	1-15
Y	DE 196 43 585 A (BEIERSDORF AG) 23 April 1998 (1998-04-23) see abstract, page 2, lines 1-26, page 4, lines 39-40, page 5, lines 55-61, page 9, line 20 with page 10, lines 1-5, claims --- -/--	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 March 2002

Date of mailing of the international search report

09/04/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stoltner, A

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/09588

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1997, no. 02, 28 February 1997 (1997-02-28) & JP 08 256977 A (OLYMPUS OPTICAL CO LTD), 8 October 1996 (1996-10-08) abstract ----	1-15
A	US 5 914 127 A (SCHNITZER JAN E) 22 June 1999 (1999-06-22) see abstract, column 2, lines 20-33, column 6, lines 39-46 ----	1-15
A	WO 94 01102 A (HOGAN JOSEPH C JR ;LEGOMER PARTNERS LP (US)) 20 January 1994 (1994-01-20) see on page 4, paragraph 2 -----	1-15

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/09588

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 04070558	A	05-03-1992	JP 2027719 C JP 7052177 B	26-02-1996 05-06-1995
DE 19643585	A	23-04-1998	DE 19643585 A1	23-04-1998
JP 08256977	A	08-10-1996	EP 0730844 A1 US 5876326 A	11-09-1996 02-03-1999
US 5914127	A	22-06-1999	US 5776770 A AU 705945 B2 AU 7013796 A CA 2228604 A1 EP 0848614 A1 JP 11514348 T US 6255457 B1 WO 9709055 A1	07-07-1998 03-06-1999 27-03-1997 13-03-1997 24-06-1998 07-12-1999 03-07-2001 13-03-1997
WO 9401102	A	20-01-1994	AU 685752 B2 AU 4659293 A BR 9306657 A CA 2139349 A1 EP 0723441 A1 JP 8500339 T WO 9401102 A1 US 6271195 B1	29-01-1998 31-01-1994 08-12-1998 20-01-1994 31-07-1996 16-01-1996 20-01-1994 07-08-2001





A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 A61K31/70 A61K31/575

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RESEARCHIERTE GEBIETE**

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, PHARMAPROJECTS

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 016, no. 272 (P-1373), 18. Juni 1992 (1992-06-18) & JP 04 070558 A (YAMAGUCHIKEN), 5. März 1992 (1992-03-05) Zusammenfassung ---	1-15
Y	DE 196 43 585 A (BEIERSDORF AG) 23. April 1998 (1998-04-23) *siehe Zusammenfassung, Seite 2, Zeilen 1-26, Seite 4, Zeilen 39-40, Seite 5, Zeilen 55-61, Seite 9, Zeile 20 mit Seite 10, Zeilen 1-5, Ansprüche* --- -/-	1-15

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. März 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

09/04/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Stoltner, A

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1997, no. 02, 28. Februar 1997 (1997-02-28) & JP 08 256977 A (OLYMPUS OPTICAL CO LTD), 8. Oktober 1996 (1996-10-08) Zusammenfassung ---	1-15
A	US 5 914 127 A (SCHNITZER JAN E) 22. Juni 1999 (1999-06-22) *siehe Zusammenfassung, Spalte 2, Zeilen 20-33, Spalte 6, Zeilen 39-46* ---	1-15
A	WO 94 01102 A (HOGAN JOSEPH C JR ;LEGOMER PARTNERS LP (US)) 20. Januar 1994 (1994-01-20) *siehe auf Seite 4, Absatz 2* -----	1-15

# INTERNATIONALEP RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/09588

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
JP 04070558	A	05-03-1992	JP	2027719 C	26-02-1996
			JP	7052177 B	05-06-1995
DE 19643585	A	23-04-1998	DE	19643585 A1	23-04-1998
JP 08256977	A	08-10-1996	EP	0730844 A1	11-09-1996
			US	5876326 A	02-03-1999
US 5914127	A	22-06-1999	US	5776770 A	07-07-1998
			AU	705945 B2	03-06-1999
			AU	7013796 A	27-03-1997
			CA	2228604 A1	13-03-1997
			EP	0848614 A1	24-06-1998
			JP	11514348 T	07-12-1999
			US	6255457 B1	03-07-2001
WO 9401102	A	20-01-1994	WO	9709055 A1	13-03-1997
			AU	685752 B2	29-01-1998
			AU	4659293 A	31-01-1994
			BR	9306657 A	08-12-1998
			CA	2139349 A1	20-01-1994
			EP	0723441 A1	31-07-1996
			JP	8500339 T	16-01-1996
			WO	9401102 A1	20-01-1994
			US	6271195 B1	07-08-2001

